Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

EINSCHRÄNKUNG DER INSULINABHÄNGIGEN GLUKOSEVERWERTUNG AM EPIDIDYMALEN FETTGEWEBE DER RATTE UNTER TRIAMTEREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1969

vorgelegt von
Hermann Voß
aus Geseke

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans H e r k e n

EINSCHRÄNKUNG DER INSULINABHÄNGIGEN GLUKOSEVERWERTUNG AM EPIDIDYMALEN FETTGEWEBE DER RATTE UNTER TRIAMTEREN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hermann Voß
aus Geseke

Dekan: Professor Dr. med. Hans Heinz N a u m a n n

Referent: Professor Dr. med. Hans H e r k e n

Korreferent: Professor Dr. med.Martin Kramer

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 9.9.1969

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG 3

METHODIK 8

ERGEBNISSE 17

I. Glukoseverwertung des Fettgewebes 17

1. Glukoseaufnahme 17

a) Glukoseabnahme im Medium 17

b) CO_2-Produktion 21

c) Einbau von Glukosemetaboliten ins Fettgewebe 23

d) Zeitverlauf 24

2. Strukturelle Erfordernisse 25

3. Aufhebung der Hemmwirkung durch

a) Hydroxylderivat des Triamterens ... 28

b) Nikotinamid und seine Derivate 28

II. Andere insulinabhängige Reaktionen 28

1. Proteinsynthese 28

2. Glykogensynthese 30

III. Beeinflussung durch Ionen 32

1. Na^+ - K^+

2. Zn^{++}

3. Mn^{++}, Mg^{++}, Fe^{+++}

4. Cr^{+++}

DISKUSSION 35

ZUSAMMENFASSUNG 45

LITERATURVERZEICHNIS . 47

E I N L E I T U N G

Bei in vitro Versuchen hemmt 6-Aminonikotinamid die durch Insulin stimulierte Glukoseaufnahme ins Fettgewebe (v. BRUCHHAUSEN 1964). Diese Verbindung ruft in vivo bei der Ratte starke Stoffwechselveränderungen hervor, die sich durch Gewichtsverlust, Unterkühlung und schwere neurologische Ausfallserscheinungen äußern. Sie besitzt aber auch ausgeprägte diuretische Eigenschaften (HERKEN, SENFT, ZEMISCH 1964). Das Zusammentreffen einer renalen Wirkung mit einem Einfluß auf die Glukoseaufnahme an der Fettgewebszellmembran, wie sie das 6-Aminonikotinamid besitzt, wirft die Frage auf, ob auch andere Diuretika am Fettgewebe wirksam sein können. Untersucht wurde bisher das Hydrochlorothiazid, das - wie auch andere Benzothiadiazinderivate - unter bestimmten Bedingungen sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte eine verminderte Glukosetoleranz verursachen kann (BREADWOOD et al. 1965; WOLF und PARMLEY 1964). FIELD und MANDELL zeigten 1964, daß Hydrochlorothiazid die periphere Insulinwirkung am Rattenfettgewebe in vitro nicht direkt hemmt, sondern daß das Fettgewebe von Ratten, die mit Chlorothiazid vorbehandelt wurden, eine verminderte Ansprechbarkeit gegen Insulin aufwies. Die kombinierte Gabe von Diazoxid und Chlorothiazid schränkt in vitro die von Insulin unabhängige Glukoseaufnahme sowohl am

Fettgewebe als auch am Diaphragma der Ratte ein, nicht jedoch die durch Insulin stimulierte Glukoseaufnahme (BARNETT und WHITNEY 1966). Nach neueren Untersuchungen von SENFT und Mitarbeitern (1966) führt Hydrochlorothiazid sowohl in vivo als auch in vitro im Muskel und in der Leber der Ratte über eine Hemmung der 3', 5',-Adenosinmonophosphat-Phosphodiesterase zu einer Erhöhung des Gehaltes an cyclischem 3',5'-Adenosinmonophosphat, die ihrerseits eine Aktivierung der Glykogenphosphorylase zur Folge hat. Ein Einfluß des Hydrochlorothiazids auf die Pankreasinkretion bzw. auf den durch Insulin stimulierten Glukosetransport ließ sich nicht nachweisen (SENFT 1966; SENFT et al. 1966). Furosemid bewirkt eine ähnliche Steigerung der Glykogenolyse, jedoch nur in der Rattenleber (SENFT et al. 1966).

Ein anderes schwaches Diuretikum - Coffein - setzt die Glukoseoxydation und -umwandlung in Triglyceride mit und ohne Insulin am Fettgewebe herab (VAUGHAN 1961; ANDERSON et al. 1966). Es unterscheidet sich hiermit trotz seiner durchweg adrenalinähnlichen metabolischen Wirkeigenschaften grundlegend vom Adrenalin, das zu einer Aktivierung der Adenylcyclase und so über einen erhöhten Gehalt an cyclischem 3', 5'-Adenosinmonophosphat zu einer vermehrten Glykogenolyse führt (SUTHERLAND 1950). ROUS und FARVAGER wiesen nach, daß Acetazolamid die Synthese von Fettsäuren in vivo bei

Mäusen hemmt und daß diese Hemmung durch Insulin aufhebbar ist.

In der vorliegenden Arbeit soll ein weiteres Diuretikum, das Triamteren, in seiner Auswirkung auf den Fettgewebsstoffwechsel untersucht werden. Triamteren, ein Triaminophenylpteridin-Derivat steigert die renale Natriumausscheidung unter gleichzeitiger Reduktion der Kaliumelimination (HERKEN und SENFT 1961). Es ist somit in seiner renalen Wirkung dem anfangs erwähnten 6-Aminonikotinamid ähnlich. Für einen gleichen Wirkmechanismus dieser beiden Diuretika spricht die Tatsache, daß durch die Gabe von Triamteren die Biosynthese abnorm strukturierter Pyridinnucleotide aus 6-Aminonikotinamid in der Tubuluszelle verhindert wird (HERKEN, SENFT und ZEMISCH 1964). Triamteren scheint eine Affinität zur austauschenden NAD(P) Nucleosidase zu haben und kann so möglicherweise ebenfalls in ein Adenindinucleotid bzw. in ein Adenindinucleotidphosphat-Analoges eingebaut werden.

Als Studienobjekt wird ein Fettgewebe bevorzugt, das wegen seiner starken Flächenausdehnung eine große Membranoberfläche bei nur geringen Zellausschnitten besitzt, das epididymale Fettgewebe der Ratte. Die Membranoberfläche dieses Gewebes nimmt bei stundenlanger Inkubation in vitro in der Zeiteinheit eine konstante Menge Glukose auf, die durch Insulin dosisabhängig gesteigert werden kann (WINEGRAD und RENOLD 1958).

Bisher sind außer körpereigenen Hormonen nur wenige Substanzen bekannt, die auf die Glukoseaufnahme ins Fettgewebe Einfluß nehmen. FAIN (1964) unterscheidet im Rattenfettgewebe drei Transportmechanismen für Hexosen:

1. die basale Fructoseaufnahme
2. die basale Glukoseaufnahme
3. die durch Insulin stimulierte Fructose- und Glukoseaufnahme.

Der basale Fructosetransport wird durch Desoxyglukose und Dexamethason nicht beeinflußt (FAIN 1964). Der basale Glukosetransport läßt sich durch Desoxyglukose, Dexamethason und andere Corticoide (LEBOEUF et al. 1962), Puromycin (DAVSON und BECK 1965), Aminonucleosid und einige Aminosäuren in hohen Konzentrationen (TELLER und BEIGELMANN 1961) hemmen. Phlorrhizin (CROFFORD und RENOLD 1965), Glukosamin (SILVERMAN 1963) und 6-Aminonikotinamid (v. BRUCHHAUSEN und HERKEN 1966) schränken ausschließlich den insulinabhängigen Anteil des Glukosetransportes ein. Dexamethason und Desoxyglukose hemmen die durch Insulin stimulierte Fructoseaufnahme, nicht jedoch die insulinabhängige Glukoseaufnahme, obwohl für beide Hexosen in Anwesenheit von Insulin der gleiche Transportmechanismus angenommen werden muß. Erklären läßt sich diese Tatsache durch eine größere Affinität der Glukose zum oben beschriebenen dritten Transportsystem (FAIN 1964).

Diese Beobachtungen stehen nicht im Widerspruch zu kinetischen Messungen der Transportvorgänge. Verschiedene Autoren (FROESCH und GINSBERG 1962, HERNANDEZ und SOLS 1963, CAYGILL und STEIN 1964, KUO et al. 1967) fanden, daß unter Insulin die maximale Transportgeschwindigkeit ansteigt, während die Michaelis-Konstante des Transportprozesses konstant bleibt. Im Gegensatz dazu geben CROFFORD und RENOLD (1965 b) einen niedrigeren Km-Wert unter Insulin an.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wirkung des Diuretikum und des möglichen Adenindinucleotid-Analogenbaustein Triamteren auf die Glukoseaufnahme ins Fettgewebe zu prüfen und durch Einbeziehung insulinabhängiger Reaktionen die Wirkung des Triamterens im Fettgewebe abzugrenzen.

M E T H O D I K

I. Material

Folgende Substanzen wurden bei den unten beschriebenen Versuchen verwandt:

2,4,7,Triamino-6-phenyl-pteridin = Triamteren
2,4,7,Triamino-6 (3,4,dimethoxyphenyl) pteridin
2,4,7,Triamino-6-p-oxyphenylpteridin
7-Amino-1,3,dimethyl-2,4,dioxo-6-phenylpteridin
Tris (diäthylaminoäthyl)-6-phenylpteridin

[1-^{14}C] Glukose spez. Aktivität 2,86 mC/mM Charge 92
2,96 mC/mM Charge 97
Radiochem.Centre Amersham, England

[1-^{14}C] Leucin spez. Aktivität 32,0 mC/mM Charge 33
Radiochem.Centre Amersham, England

Insulin 40E/ml Fa. Hoechst

Blutzuckerfarbtest: Fa. C.F. Boehringer und Söhne, Mannheim

Hydroxyd des Hyamins: p-(diisobutyl-cresoxyäthoxy-äthyl) dimethyl-benzylammoniumhydroxyd.
Fa. Packard Instr.Comp.Inc.

Scintillatortoluol: 4 Gramm PPO
2,5,Diphenyloxazol
Fa. Packard
und 50 mg POPOP
1,4,bis-2 (4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)Benzon
Fa. Packard
in 1 l Toluol

Das Inkubationsmedium ist, wenn nicht anders vermerkt, Krebs-Ringer-Puffer Lösung mit 1 % Gelatinezusatz. Es hat folgende Zusammensetzung:

Gelatine	1300	mg
NaCl	900	mg
$NaHCO_3$	273	mg
KCl	46	mg
$CaCl_2$	36,6	mg
$MgSO_4$	38,2	mg
KH_2PO_4	21,1	mg

Die Zahlen beziehen sich auf 130 ml Inkubationsmedium. Das Medium wurde unmittelbar vor jedem Versuch frisch hergestellt. Dabei wurden 273 mg $NaHCO_3$ gesondert in 25 ml dest. Wasser gelöst und 20 Minuten lang kräftig mit Carbogen durchperlt, um den p_H Wert auf 7,4 einzustellen. Beim kaliumfreien Medium sind alle Kaliumsalze durch stöchiometrische Mengen der entsprechenden Natriumsalze ersetzt, beim natriumfreien Medium sind die Natriumsalze durch entsprechende Kaliumsalze ersetzt.

Die Medien haben dann folgende Zusammensetzung:

K a l i u m f r e i		N a t r i u m f r e i	
Gelatine	1300 mg	Gelatine	1300 mg
NaCl	946,4 mg	KCl	1191 mg
$NaHCO_3$	273 mg	$KHCO_3$	325 mg
NaH_2PO_4+2 H_2O	24,2 mg	KH_2PO_4	21,1 mg
$CaCl_2$	36,6 mg	$CaCl_2$	36,6 mg
$MgSO_4$	38,2 mg	$MgSO_4$	38,2 mg

Die Gewichtsangaben beziehen sich wieder auf 130 ml Inkubationsmedium.

Triamteren wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn heiß (70-80° C) gelöst und vor Zugabe der Fettgewebsstückchen dem Inkubationsmedium in entsprechender Menge zugesetzt.

II. Gewinnung des Fettgewebes

Männliche Wistar Ratten wurden bis Versuchsbeginn mit Altromin(R) ad libitum gefüttert, dekapitiert und entblutet. Nach Eröffnung der Bauchhöhle ließ sich der Hoden mit dem epididymalen Fettanhang leicht herauspräparieren. Je nach Anzahl der Inkubationsgefäße wurden 6-10 möglichst gleichgroße Stücke von dem dünnen, schleierartigen Teil des epididymalen Fettanhanges abgeschnitten und sofort in die vorpipettierten Inkubationsgefäße überführt. Jedes Inkubationsgefäß erhielt von jedem der dekapitierten Tiere ein Gewebsstück. Die durchschnittliche Gewebsmenge betrug 150 mg. Die Präparation erfolgte unter größtmöglicher Schonung des Gewebes.

III. Inkubation des Fettgewebes und Bestimmung der Glukoseabnahme im Medium

Die Inkubation erfolgte in 25 ml Erlenmeyer-Kolben (Abb. 1a) im Wasserbad bei 37° C unter ständigem Schütteln der Gefäße. Jeder Inkubationsansatz erhielt, wenn nicht anders vermerkt, 5 ml Krebs-Ringer-Puffer mit 1 µm/ml Glukose und gegebenenfalls 1 mE/ml Insulin. Die Erlenmeyer-Kolben wurden mit einem doppelt durchbohrten Gummistopfen fest verschlossen und unmittelbar vor Versuchsbeginn 5 Minuten mit Carbogen durchströmt.

Zur Bestimmung der Glukoseabnahme im Außenmedium wurde stündlich ein aliquoter Teil, meist 0,1 ml, entnommen und mit 3 ml des Blutzucker-Farbtestes der Fa. Boehringer versetzt. Nach 35 Minuten wurden 3 ml 10n H_2SO_4 zugegeben und die dabei entstehende rote Farbe im Beckmann Photometer bei 546 mµ gemessen.

Vorrichtung zum Begasen des Inkubationsmediums mit Carbogen

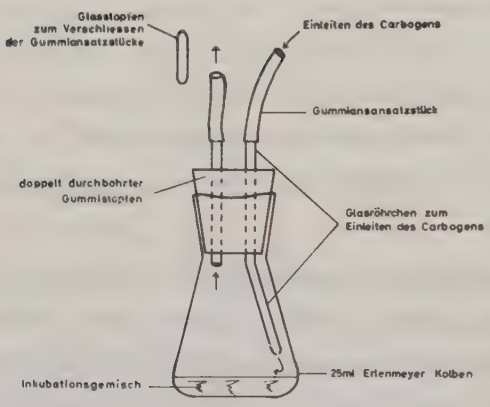


Abb. 1a

IV. Bestimmung der $^{14}CO_2$ - Produktion

Zu dem oben beschriebenen Inkubationsansatz wurden 0,1 ml 1-^{14}C -Glukose = 0,2 µC zupipettiert. Nach dem Begasen mit Carbogen erhielten die Gefäße eine Vorrichtung zum Auffangen des radioaktiven CO_2 und wurden mit einer durchstechbaren Gummikappe luftdicht verschlossen (Abb. 1b). Nach dreistündiger Inkubations-

dauer spritzte ich mit einer Tuberkulinspritze durch die Gummikappe in jedes Glasröhrchen 0,4 ml Hyamin und danach mit einer anderen Tuberkulinspritze 0,25 ml 10 % H_2SO_4 in das Inkubationsmedium. Die verschlossenen Gefäße blieben für weitere 2 Stunden im Schüttelapparat, dann wurden die Gummikappen entfernt und die Glasröhrchen mit dem Hyamin in Scintillationsgefäße überführt, die 10 ml Scintillatortoluol enthielten. Aus dem Medium entnahm ich zweimal 0,1 ml zur Bestimmung der Glukoseabnahme.

Vorrichtung zum Auffangen von $^{14}CO_2$

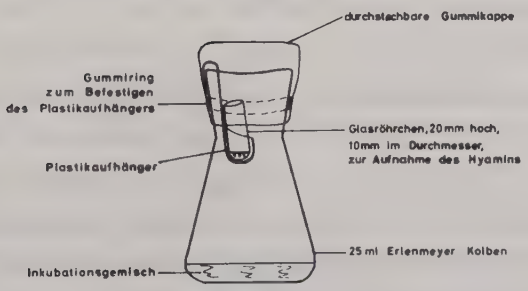


Abb. 1b

V. Extraktion und Trennung der Gewebslipide

Die Inkubationstechnik war ähnlich wie unter Punkt IV beschrieben. Am Ende der Inkubationszeit wurden 0,4 ml Hyamin in die kleinen Gefäße gespritzt zur Bindung des in der Gasphase enthaltenen CO_2. Nach weiteren 10 Minuten wurden die Gewebe aus den Erlenmeyer Kolben entfernt, diese mit den Gummikappen wieder verschlossen und 0,25 ml H_2SO_4 in das Medium gespritzt, um das CO_2 aus dem Medium freizusetzen. Dann blieben die Kolben für weitere zwei Stunden im Schüttelapparat. Die weitere Durchführung geschah wie unter Punkt IV beschrieben. Die Isolation und Reinigung der Gesamtlipide aus den so inkubierten Fettgewebsstückchen erfolgte nach der Methode von FOLCH, LEES und SLOANE-STANLEY (1957). Das Fettgewebe wurde nach der Entnahme aus den Inkubationsgefäßen abgetupft, zweimal mit Krebs-Ringer-Puffer nachgewaschen und in 5 ml Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1) homogenisiert. Das Homogenat wurde filtriert und viermal mit 2 ml synthetischer "oberer Phase" ausgewaschen. Die verbleibende untere Phase wurde eingedampft und ein aliquoter Teil zur Zählung der Radioaktivität der Gesamtlipide abgenommen.

Die Trennung der Phosphatide und Neutrallipide erfolgte säulenchromatographisch nach dem BORGSTRÖMschen Verfahren mit einer Kieselgelsäure (Kieselgel 0,05 - 0,2 mm für Chromatographie der Fa. Merck, Darmstadt). Die

Neutrallipide wurden mit KOH verseift und das mit HCl angesäuerte Verseifungsgemisch dreimal mit 10 ml Chloroform ausgewaschen, um die freien Fettsäuren vom Glyzerin zu trennen. Ein aliquoter Teil aller Lipidfraktionen wurde in 10 ml Scintillatortoluol zur Zählung der Radioaktivität pipettiert.

VI. Extraktion der Gewebsproteine

Die Gläser wurden mit 0,3 µC $\left[1\text{-}^{14}C\right]$ -Leucin inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug drei Stunden, die Technik war wie unter Punkt V beschrieben.

Die Extraktion der Gewebsproteine aus den mit $\left[1\text{-}^{14}C\right]$-Leucin inkubierten Fettgewebsstückchen erfolgte nach der modifizierten Methode von HERRERA und RENOLD (1960). Die abgetupften und gewaschenen Fettgewebsstückchen wurden in einem Aethanol-Aether-Perchlorsäuregemisch (3 ml) mit 30 mg Albumin als Trägersubstanz nach dem Verfahren von POTTER und ELVEHJEM homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert und der Niederschlag dreimal mit einem Aethanol-Aether-Chloroform Gemisch, zweimal mit 90^{o} heißer Trichloressigsäure und schließlich zweimal mit Aether gewaschen. Nach der letzten Wäsche ließ ich den weißen Niederschlag trocknen, löste ihn in 10 % NaOH auf und pipettierte von dieser Lösung einen aliquoten Teil in 4 ml Aethanol und 8 ml Scintillatortoluol zur Bestimmung der Radioaktivität.

VII. Extraktion des Gewebsglykogens

Die Inkubationsansätze und die technische Durchführung waren genau wie unter Punkt V beschrieben.

Das Gewebsglykogen wurde nach der Methode von GOOD et al. (1933) gewonnen. Die nach der Inkubation gewaschenen und gewogenen Gewebsstückchen wurden mit einem Zusatz von 20 mg Glykogen als Trägersubstanz in 2 ml 30 % KOH in kochendem Wasser hydrolysiert. Durch Zusatz von Aethanol fiel das Glykogen aus. Beim Zentrifugieren 15 Minuten lang bei 3000 Rpm bildete sich in den Gläsern ein weißer Bodenbelag, der viermal mit Aethanol gewaschen und nach dem Trocknen mit 2 ml 1n H_2SO_4 zur Hydrolyse aufgelöst wurde. Nach dem Hydrolysieren nahm ich einen aliquoten Teil zur Glukosebestimmung und zur Bestimmung der Radioaktivität ab.

VIII. Berechnungen

Alle Werte werden in Mittelwerten aus je 4 Einzelbestimmungen angegeben. Die Streuungen werden als Standardabweichungen eingetragen.

E R G E B N I S S E

I. Glukoseverwertung des Fettgewebes

1. Glukoseaufnahme

a) Glukoseabnahme im Medium

In Übereinstimmung mit Literaturangaben vermag das epididymale Fettgewebe bei mehrstündiger Inkubation Glukose aus dem Außenmedium aufzunehmen. Dieser "basale Glukosetransport" wird bei Zugabe von Insulin um das Mehrfache gesteigert. Die Größenordnung dieserGlukoseaufnahme schwankt von Tiergruppe zu Tiergruppe und ist vor allem vom Alter, respektive dem Tiergewicht abhängig (HAGEN, BALL und COOPER 1959). Trotzdem läßt sich ziemlich konstant unter Insulin die Glukoseaufnahme um das zweifache steigern. Dieser "insulinabhängige Glukosetransport" bleibt über Stunden konstant. Dies zeigt die Abb. 2, in der die Abnahme der Glukosegesamtmenge im Außenmedium gegen die Zeit dargestellt ist. In dieser Darstellung blieben die Gewebsgewichte unberücksichtigt. Bei den folgenden Zahlenangaben wurde die Glukoseabnahme pro 6 Stunden jeweils aus den Glukosezeitkurven abgelesen und auf 100 mg Fettgewebe umgerechnet.

Dem 3. Diagramm der Abb. 2 ist zu entnehmen, daß Triamteren in einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ M im Außenmedium trotz wirksamer Insulinzugabe die Glukose-

aufnahme im Bereich der "basalen Glukoseaufnahme" hält. Triamteren in dieser Konzentration scheint also die insulinabhängige Glukoseaufnahme ins Fettgewebe zu hemmen.

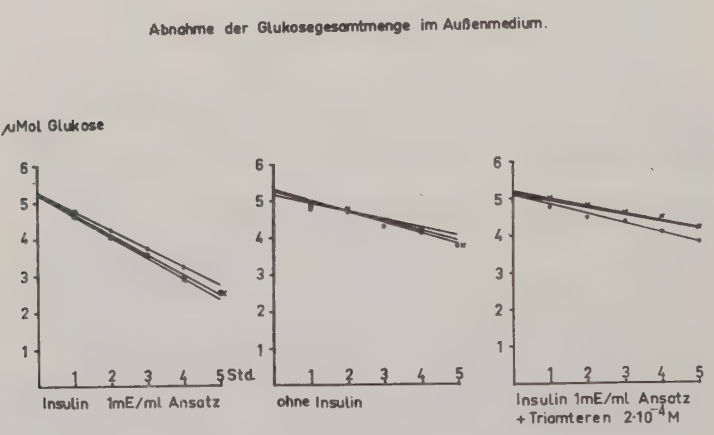


Abb. 2

Die aus den Glukosezeitkurven der Abb. 2 ermittelte Glukoseaufnahme ergibt nach Umrechnung auf 6 Stunden und 100 mg Gewebe das Bild der Abb. 3. Die Streuungen wurden als mittlerer Fehler des Mittelwertes aufgetragen. Die Abb. 3 zeigt, daß die insulinabhängige Glukoseaufnahme durch Triamteren in einer Konzentration von 2.10^{-4} M vollständig gehemmt wird. Diese

Hemmung tritt auch dann ein, wenn Insulin in einer Konzentration von 10mE/ml Ansatz vorhanden ist

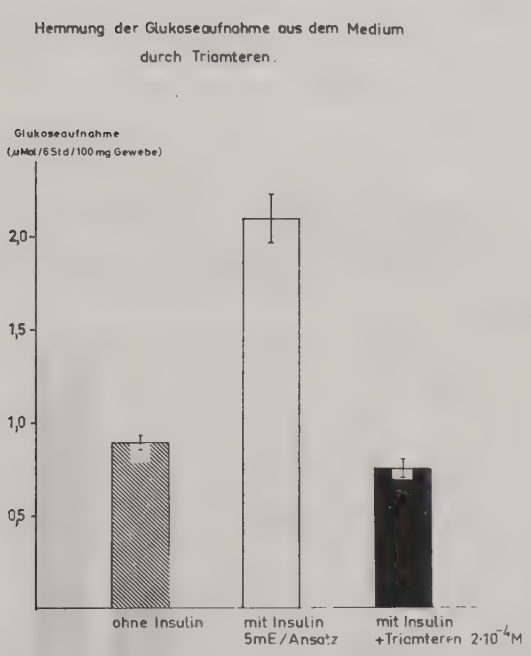


Abb. 3

Dieser Effekt des Triamterens ist halbmaximal mit einer Konzentration von 5.10^{-5} M auslösbar (Abb.4). Diesen Angaben kommt wegen der hohen Lipoidlöslichkeit des Triamterens nur ein relativer Wert zu. Bei Verwendung höherer Gewebsgewichte sind zur Erzielung des gleichen Effektes höhere Triamterenkonzentrationen erforderlich.

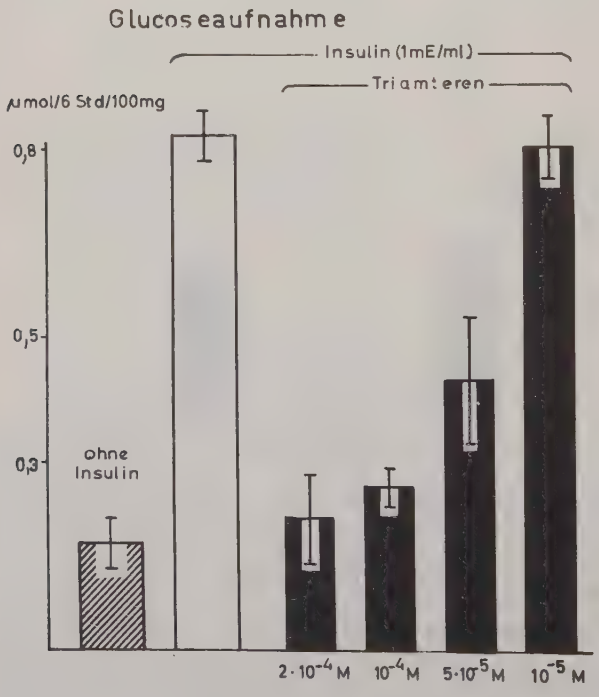


Abb. 4

b) CO_2-Produktion

Von vielen Untersuchern wird statt der Glukoseaufnahme die $^{14}CO_2$-Produktion aus $\left[1-^{14}C\right]$ -Glukose gemessen (DITSCHUNEIT et al. 1959; WINEGRAD und RENOLD 1958). Voraussetzung dafür ist die vollständige Verstoffwechselung der in die Zelle eingedrungenen Glukose. Dies trifft für die von uns gewählten Konzentrationen zu. Die gleiche Tendenz wie bei der Glukoseaufnahme zeigt sich bei der CO_2-Produktion unter verschiedenen Triamterenkonzentrationen. Auch hier hemmt das Triamteren die Insulinwirkung auf das Fettgewebe (Abb.5).

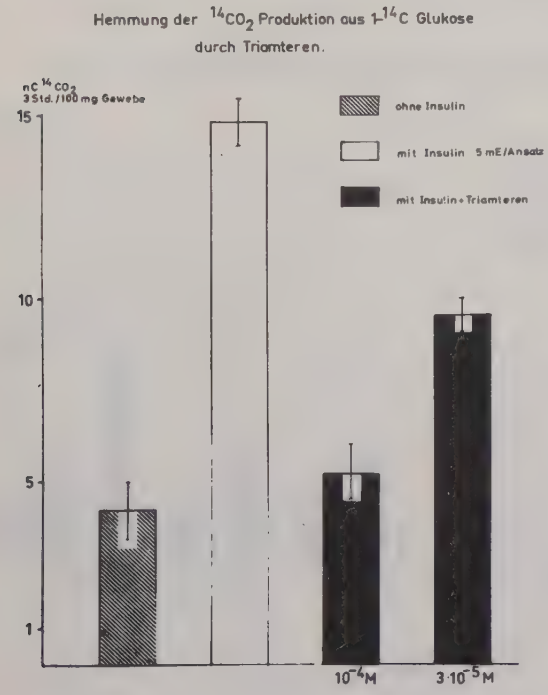


Abb. 5

Zur Beurteilung der Relation zwischen Glukoseaufnahme und CO_2-Produktion habe ich korrespondierende Werte für die zeitliche Glukoseabnahme im Medium und die CO_2-Produktion des gleichen Zeitraums aus verschiedenen Versuchen aufgetragen (Abb. 6). Es ergibt sich eine lineare Korrelation zwischen der Glukoseabnahme im Medium und der CO_2-Produktion für die Bedingungen der "basalen Glukoseaufnahme" sowie der "insulinbedingten Glukoseaufnahme" ins Fettgewebe. Triamteren verschiebt diese Korrelation zu Gunsten der CO_2-Produktion. Der Quotient aus CO_2-Produktion und Glukoseaufnahme liegt hierbei im Mittel um 30 % über den anderen Werten.

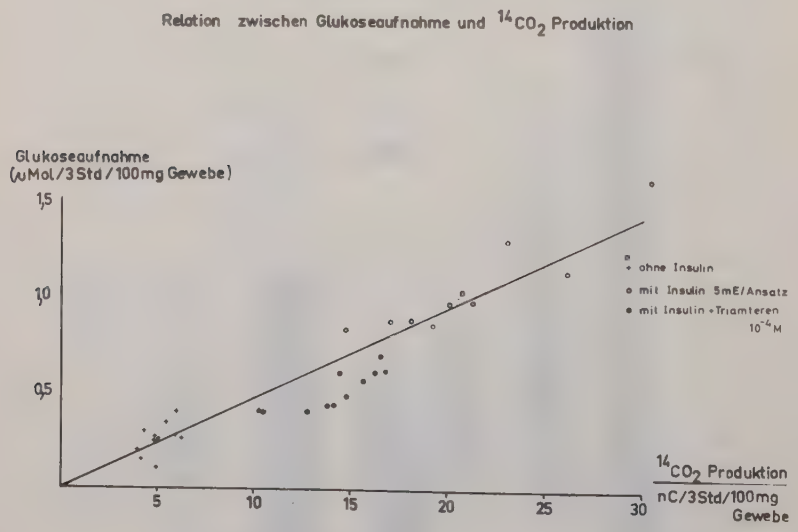


Abb. 6

c) Einbau von Glukosemetaboliten ins Fettgewebe

Ein Teil der ins Fettgewebe aufgenommenen Glukose wird umgebaut und in andere Produkte, z.B. Lipide eingebaut. Die Verteilung der Radioaktivität aus $[1-^{14}C]$ - Glukose in den Lipiden - wie Lipidgesamtfraktion, Neutralfraktion, Phosphatide, freie Fettsäuren - läßt sich aus Abb. 7 ablesen. Nach der gewählten Versuchsdauer von 2 Stunden zeigen die Phosphatide so gut wie keine radioaktive Markierung. Alle anderen Fraktionen nehmen beträchtlich Radioaktivität auf. Das Ausmaß der Markierung in den Vergleichsgruppen (ohne Insulin, Insulin allein, Insulin und Triamteren) entspricht ihren CO_2- Werten.

Markierung von Lipidfraktionen nach Zusatz von $1-^{14}C$-Glukose

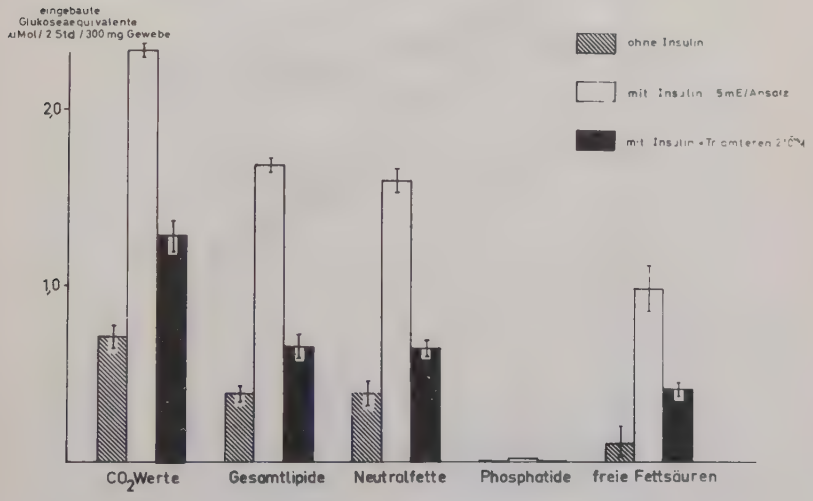


Abb. 7

d) Zeitverlauf

Alle bisher erwähnten Befunde wurden dadurch erhalten, daß Triamteren unmittelbar vor der Inkubation zugesetzt wurde. Es ergab sich kein Anhalt für eine verspätet einsetzende Hemmwirkung des Triamterens. Um dies zu erhärten, wurde die Wirkung verspäteter Zugabe von Triamteren aus insulinhaltigem Medium untersucht (Abb. 8).

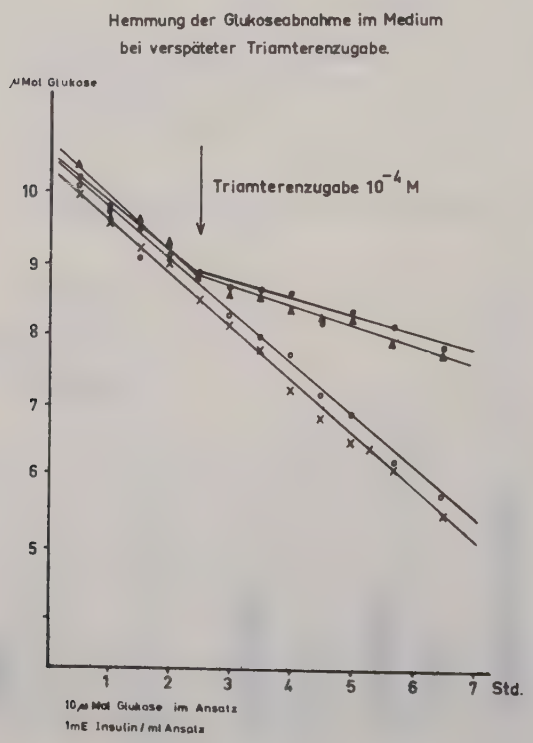


Abb. 8

Abb. 8 zeigt, daß die bis zum Zeitpunkt der Triamterenzugabe linear verlaufende Glukoseabnahme im Medium schon 30 Minuten nach dem Zusetzen des Triamterens deutlich abgeschwächt ist. Die Interpolation läßt ein Abknicken der Kurven im Zeitpunkt der Zugabe erkennen.

2. Strukturelle Erfordernisse

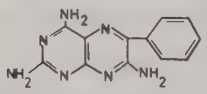
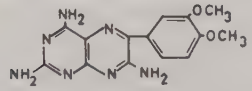
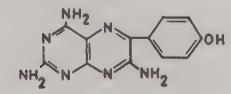
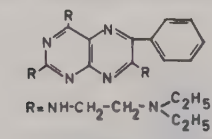
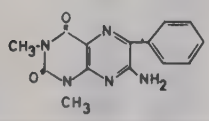
Substanz		
Formel	Name	
	2,4,7-Triamino 6-phenyl-pteridin TRIAMTEREN	9a
	2,4,7-Triamino-6(3',4'dimethoxyphenyl)-pteridin	9b
	2,4,7-Triamino-6-p-oxyphenyl-pteridin	9c
	Tris(diäthylaminoäthyl)-6-phenyl-pteridin	9d
	7-Amino-1,3 dimethyl-2,4 dioxo-6-phenyl-pteridin	9e

Abb. 9

Die oben beschriebene Hemmung der Glukoseaufnahme ins Fettgewebe wird durch Triamteren, einem Triamino-phenyl-pteriden ausgelöst. Um abzugrenzen, in wieweit die Hemmwirkung des Triamterens an das Pteridingerüst gebunden ist, wurden ähnlich gebaute Pteridinverbindungen in die Versuchsanordnung eingesetzt. Unter den untersuchten Verbindungen befanden sich das am Phenylkern dimethoxylierte Derivat des Triamterens (Abb. 9b) sowie das am Phenylkern para hydroxylierte Derivat des Triamterens (Abb. 9c), das an allen 3 Aminogruppen diaethylaminoaethylierte Triamteren (Abb. 9d) und schließlich ein Amino-dimethyl-dioxo-phenyl-pteridin (Abb. 9e). Die Substanzen 9d und 9e erwiesen sich in Konzentrationen von 10^{-4} M als unwirksam. Dagegen vermochte die Substanz 9b gleichzeitig wie das Triamteren die Glukoseaufnahme zu hemmen (Abb. 10), während die Substanz 9c, an sich ohne Wirkung, die Triamterenhemmwirkung einschränkte (Abb. 11).

Hemmung der Glukoseaufnahme durch Triamteren
und sein dimethoxyliertes Derivat

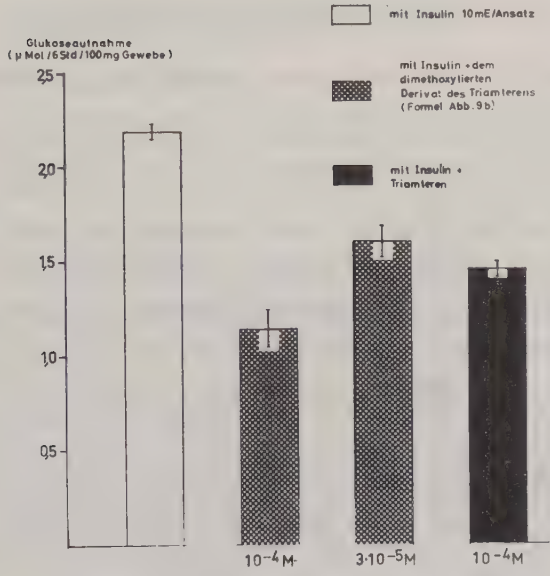


Abb. 10

Einschränkung der Triamterenhemmwirkung durch das p-Hydroxylderivat

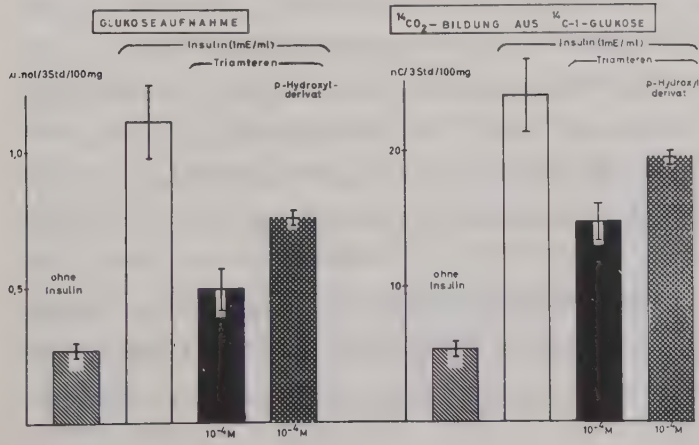


Abb. 11

3. Aufhebung der Hemmwirkung

a) durch das Hydroxylderivat des Triamterens

Die Hemmwirkung des Triamterens auf die Glukoseaufnahme wird durch das p-Hydroxylderivat um etwa 30 % eingeschränkt, wenn beide Substanzen in der gleichen Konzentration vorliegen (Abb. 11).

Ist das p-Hydroxylderivat in einer dreifach höheren Konzentration als das Triamteren vorhanden, beträgt die Einschränkung der Hemmwirkung etwa 50 %. Die gleiche Tendenz spiegelt sich in den Werten der CO_2-Bildung wider.
Das p-Hydroxylderivat allein verändert nicht die basale, bzw. die durch Insulin stimulierte Glukoseaufnahme.

b) durch Nikotinamid und seine Derivate

Da sich die analoge Hemmwirkung des 6-Aminonikotinamids durch Nikotinamid und Adenindinucleotid aufheben ließ, wurde versucht, die Triamterenhemmwirkung durch diese Substanzen einzuschränken. Selbst in mM Konzentrationen im Außenmedium nahmen die Substanzen keinen Einfluß auf die durch Triamteren bedingte Hemmwirkung auf die Glukoseaufnahme und die CO_2-Produktion aus $[1\text{-}^{14}C]$-Glukose.
Zahlreiche frühere Versuche hatten ergeben, daß Nikotinamid bzw. Adenindinucleotid die Glukoseaufnahme in den verwendeten Konzentrationen nicht beeinflussen (v.BRUCH-

HAUSEN, unveröffentlichte Versuche).

II. Andere insulinabhängige Reaktionen

1. Proteinsynthese

Bei der Beurteilung einer der Insulinwirkung gegenläufigen Hemmwirkung scheint es sinnvoll, insulinabhängige Reaktionen zu studieren, deren primärer Mechanismus vom Glukosetransport unabhängig ist. Zu diesen Reaktionen zählen die Proteinsynthese und die Glykogensynthese.

Als Maß der Proteinsynthese konnte der Einbau von $\left[1\text{-}^{14}C\right]$ - Leucin in den fettreichen Rückstand des Fettgewebes gewertet werden, da nach KRAHL (1959) und GOODMAN (1966) die Aufnahme von Aminosäuren ins Fettgewebszellinnere insulinunabhängig verläuft.

In Übereinstimmung mit dieser Annahme ergaben sich nach dreistündiger Inkubation des Fettgewebes mit $\left[1\text{-}^{14}C\right]$- Leucin keine Unterschiede der Radioaktivität im Außenmedium. Die insulinbedingte Mehraufnahme von Leucin ins Protein des Fettgewebes erwies sich unter Triamteren auch hier als hemmbar. Der zahlenmäßige Beleg ist der Abb. 12 zu entnehmen, die gleichzeitig auch eine entsprechende Hemmwirkung des in Abb. 9 b dargestellten Triamterenderivates zeigt, das in einer Konzentration von 10^{-4}M vorliegt.

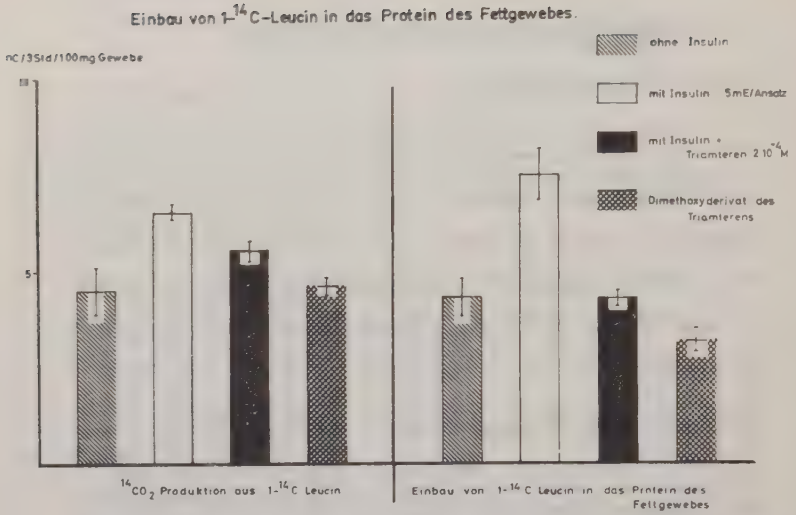


Abb. 12

2. Glykogensynthese

Wie die Abb. 13 zeigt, ließ sich die durch Insulin gesteigerte Glykogensynthese durch Triamteren in einer Konzentration von 2.10^{-4} vollständig hemmen.

EINBAU VON ^{14}C-1-GLUKOSE
INS FETTGEWEBS-GLYCOGEN

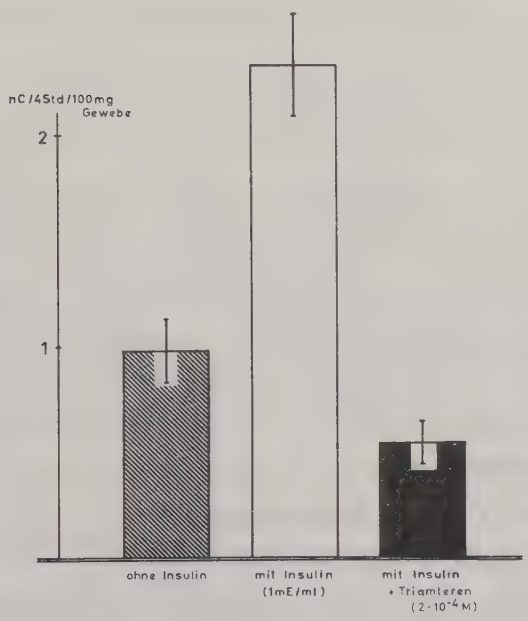


Abb. 13

III. Beeinflussung durch Ionen

1. Beeinflussung durch Alkali-Ionen

Der Wirkungsmechanismus des Triamterens an den Tubuluszellmembranen der Niere wird als Störung des Natrium-Kalium Austausches aufgefaßt. Triamteren steigert die renale Natriumausscheidung unter gleichzeitiger Reduktion der Kaliumausscheidung. Die Verbindung ist jedoch kein Aldosteronantagonist, wie ursprünglich angenommen wurde. Die gleichen Effekte sind auch bei adrenalektomierten Tieren zu beobachten(HERKEN und SENFT 1961).

Die Mitbeteiligung von Alkali-Ionen auf den insulinabhängigen Glukosetransport wird von HAGEN, BALL und COOPER (1959) beschrieben. In ihren Versuchen am Fettgewebe sahen diese Autoren eine etwa 50 % Einschränkung des Insulineffektes, wenn sie das Außenmedium einseitig völlig aus Natrium- oder Kaliumionen aufbauten. Ich prüfte die Auswirkung des Triamterens unter diesen Bedingungen, zumal die Struktur des Triamterens komplexbildende Eigenschaften vermuten läßt. Erwartungsgemäß liegen die erhaltenen Glukoseaufnahmekurven für insulinfreies und insulinhaltiges Medium bei fehlendem Natrium im Außenmedium niedriger als bei normalem Krebs-Ringer-Puffer. Triamteren erweist sich unter diesen Bedingungen als nicht weniger wirksam, sondern verhindert die Glukoseaufnahme aus dem Medium vollständig (Tab. 1).

Bei Verwendung von kaliumfreiem Medium wich das erhaltene Bild von dem unter Normalbedingungen nicht ab.

Tab. 1 Auswirkung einseitig ionenverarmter Medien auf die Glukoseaufnahme im Fettgewebe unter Insulin sowie unter Insulin und Triamteren (10^{-4}M).

Zahlenangaben in µmol/ 6 Std./100 mg Fettgewebe, mit mittl. Fehler des Mittelwertes.

Bedingungen (Angaben in µval/ml)	ohne Zusätze	mit Insulin (1 mE/ml)	mit Insulin und Triamteren ($2 \cdot 10^{-4}$M
Normalmedium (Na:143; K: 6)	$0{,}80 \pm 0{,}04$	$2{,}13 \pm 0{,}14$	$0{,}54 \pm 0{,}09$
Natriumfreies M. (Na: 0; K: 149)	$0{,}53 \pm 0{,}04$	$0{,}87 \pm 0{,}07$	0 nicht meßbar
Normalmedium (Na:143; K: 6)	$0{,}89 \pm 0{,}04$	$2{,}10 \pm 0{,}17$	$0{,}75 \pm 0{,}04$
Kaliumfreies M. (Na:149; K: 0)	$1{,}63 \pm 0{,}19$	$2{,}15 \pm 0{,}14$	$0{,}85 \pm 0{,}10$
Natriumfreies M. (Na: 0; K: 6 isoosmotisch mit Cholinchlorid)	$0{,}46 \pm 0{,}18$	$1{,}09 \pm 0{,}20$	$0{,}09 \pm 0{,}02$

2. Beeinflussung durch Schwermetallionen

a) Zinkionen

Die Beziehung des Insulins zu Zinkionen, insbesondere das Vorkommen von unlöslichen Zinkkomplexen in den B-Zellen des Inselgewebes ließen eine Zugabe von Zinkionen zu den Ansätzen ratsam erscheinen. Obwohl kein direkter Nachweis von Zinkionen für die Insulinwirkung erbracht werden konnte (SUND 1965), könnten sich trotzdem die oben erwähnten komplexbildenden Eigenschaften des Triamterens auf geringste Zinkspuren des zugesetzten Insulins und damit auf seine Transportfunktion auswirken. Zusatz von 2.10^{-4} M Zinkionen veränderten jedoch das Ausmaß der Triamterenhemmwirkung auf die Glukoseaufnahme und die CO_2-Produktion nicht.

b) Mangan, Magnesium, Eisen

Auch andere Ionen wie Mangan, Magnesium und Eisen nehmen keinen Einfluß auf die Triamterenhemmwirkung.

c) Chrom

Die Sonderstellung der Cr^{+++} Ionen als Aktivator des Insulins für den Zuckertransport ins Fettgewebe wurde von MERTZ und ROGINSKI 1963 beschrieben. Ihre Bindung an Thiol-Disulfidbindungen spielt dabei eine besondere Rolle (CHRISTIAN et al. 1963). Zusätze von Cr^{+++} Ionen in Konzentrationen von 2.10^{-4} M, 10^{-4} M und 5.10^{-5} M beeinflussen die Hemmwirkung des Triamterens auf die insulinabhängige Glukoseaufnahme nicht.

D I S K U S S I O N

Aus den beschriebenen Versuchen geht hervor, daß Triamteren die Glukoseaufnahme des Fettgewebes in vitro herabzusetzen vermag, soweit sie durch Insulin anzuregen ist. Triamteren hemmt also die insulinabhängige Glukoseaufnahme. Insulin fördert nach den heutigen Vorstellungen der Insulinwirkung am Fettgewebe den Transport der Glukose in die Zellen (CROFFORD und RENOLD 1965 a). Dies wurde mit Hilfe von 3-O-Methylglukose bewiesen. Darüber hinaus folgt dieser Zucker einem Gegentransportmechanismus (CROFFORD und RENOLD 1965 b). Das Fettgewebe reagiert damit analog dem Diaphragma der Ratte, bei dem durch Insulin gesteigerte Komplexbildungen bestimmter Polypeptide mit Glukose nachgewiesen wurden.

Die Glukosephosphorylierung begrenzt bei den eingesetzten Glukosekonzentrationen die Glukoseaufnahme ins Fettgewebe nicht (JEANRENAUD und RENOLD 1959). Das Gewebe enthält ausreichend Hexokinase (DI PIETRO 1963) in zweierlei Form (KATZEN und SCHIMKE 1965), von denen eine durch Enzymaktivierung (SOLS, SILLERO und SALAS 1965) durch Insulin stimulierbar ist (MOORE, CHANDLER und TETTENHORST 1964). Die Wirkung des Triamterens auf die Glukoseaufnahme ist demnach die Störung des Transportes durch die Zellmembran anzusehen.

Der Befund der eingeschränkten CO_2 - Produktion

aus Glukose unter Triamteren steht dieser Annahme nicht entgegen. Diese Meßgröße entspricht der eingeschleusten Glukose (WINEGRAD und RENOLD 1958; DITSCHUNEIT et al. 1959), und wird daher zur routinemäßigen Insulinbestimmung herangezogen. Die Bildung radioaktiven CO_2 aus [1-^{14}C]-Glukose fußt auf der starken Bedeutung des Pentosephosphatcyclus im Fettgewebe (FLATT und BALL 1964; LANDAU und KATZ 1964). Nach dem Transport in die Zelle wird Glukose zu Glukose-6-phosphat phosphoryliert. Der weitere Abbau kann nun über den Pentosephosphatcyclus oder durch die Glykolyse erfolgen. Beim Pentosephosphatcyclus findet zunächst eine direkte Glukoseoxydation am 1-C Atom statt. Durch Dehydrierung an diesem C-Atom wird die Glukose-6-phosphat in Glukonsäure-6-phosphat umgewandelt. Daraus entsteht in einem zweiten Schritt durch weitere Dehydrierung unter gleichzeitiger Abspaltung des 1-C Atomes als CO_2 Ribulose-5-phosphat. Das radioaktiv markierte 1-C Atom wird bei diesem Abbauweg im Gegensatz zur Glykolyse schon frühzeitig als radioaktiv markiertes CO_2 freigesetzt.

Das Verhältnis zwischen $^{14}CO_2$ Produktion aus [1-^{14}C]-Glukose und Glukoseaufnahme erscheint für Triamteren allerdings geringfügig höher. Dies geht besonders gut aus der zahlenmäßigen Erfassung des Anteils hervor, der von der aufgenommenen Glukose über den Pentosephosphatcyclus unter CO_2 Abspaltung weitergeleitet

Tab. 2

Glukoseaufnahme		CO_2 - Bildung			Bilanz bezogen auf die gemessene Glukoseaufnahme (=100%)	
Meßwert µMol/3Std./ 100 mg	Umrechnung in % der vorgelegten Glukose	Meßwert mC/3 Std./ 100 mg	Umrechnung in µMol/ 3Std./100mg	Umrechnung in % der vorgelegten Glukose	Anteil über Pentose-phosphat-cyclus	Differenz
ohne Zusätze						
0,30	5,92	4,37	0,111	2,18	37,0	63,0
0,25	4,94	4,86	0,123	2,43	49,2	51,8
0,27	5,33	5,96	0,151	2,98	56,0	44,0
0,27	5,33	4,98	0,126	2,49	46,7	53,3
0,20	3,96	3,95	0,098	1,98	49,9	50,1
0,40	7,90	5,95	0,151	2,98	40,3	59,7
0,34	6,70	5,49	0,139	2,75	41,0	59,0
0,28	5,52	4,85	0,123	2,43	44,0	56,0
0,25	4,93	4,91	0,124	2,46	49,6	50,4
0,26	5,14	6,25	0,158	3,13	60,8	39,2
0,28 ± 0,04	5,57 ± 0,76	5,16 ± 0,60	0,130 ± 0,015	2,58 ± 0,29	47,5 ± 5,6	52,5 ± 5,6
mit Insulin						
0,96	18,9	20,17	0,510	10,09	53,1	46,9
1,13	22,2	20,22	0,512	10,11	45,3	54,7
0,83	16,4	14,83	0,375	7,42	45,2	54,8
0,98	19,4	21,48	0,545	10,74	55,6	44,4
0,87	17,2	17,18	0,435	8,59	50,0	50,0
1,03	20,2	20,90	0,530	10,45	51,5	48,5
0,87	17,2	18,29	0,462	9,15	53,1	46,9
1,31	25,8	23,14	0,590	11,57	45,0	55,0
1,61	31,8	30,58	0,775	15,29	48,1	51,9
0,83	16,4	19,34	0,487	9,67	56,6	43,5
1,22	24,1	29,48	0,747	14,74	61,2	38,8
1,06 ± 0,19	20,9 ± 3,6	21,42 ± 3,50	0,542 ± 0,088	10,70 ± 1,72	50,3 ± 4,2	49,7 ± 4,2
	mit Insulin und Triamteren					
0,56	11,1	-	-	-	-	-
0,60	11,8	14,50	0,370	7,25	61,6	38,4
0,70	13,8	16,67	0,425	8,34	60,7	39,3
0,56	11,1	15,64	0,399	7,82	71,3	28,7
0,41	8,1	10,16	0,259	5,08	63,2	36,8
0,44	8,7	13,92	0,355	6,96	80,7	19,3
0,52	10,3	-	-	-	-	-
0,40	7,9	10,21	0,258	5,11	64,5	35,5
0,44	8,7	14,02	0,360	7,01	81,9	18,1
0,40	7,9	12,80	0,326	6,40	81,5	18,5
0,61	12,0	16,93	0,432	8,47	70,9	29,1
0,51 ± 0,08	10,1 ± 1,7	13,77 ± 1,99	0,354 ± 0,048	6,94 ± 0,93	70,7 ± 7,3	29,3 ± 7,3

wird. Die Tabelle 2 zeigt, daß dieser Anteil unter Normalbedingungen und unter Insulin etwa die Hälfte, unter Insulin und Triamteren über 70 % ausmacht. (Triamteren allein bewirkt diese Verschiebung des Anteils nicht, wie aus Vorversuchen hervorgeht.) Es muß daher angenommen werden, daß unter Triamteren der Abbauanteil über den Pentosephosphatcyclus größer ist, oder aber die Verwertung des markierten Anteils der Glukose für andere Stoffwechselprozesse geringer ist als bei Normalzuständen. Hinweise auf einen vermehrten Abstrom von Glukoseabbauprodukten in Lipide, namentlich Triglyceride, deren Glycerin- (CAHILL et al. 1959) und Fettsäureanteil Glukoseabbauprodukte verwerten, und in Glykogen lassen sich nicht erkennen.

Insulin vermag noch weitere Stoffwechselvorgänge unabhängig vom Glukosetransport anzuregen. Zu diesen gehören die RNS-Synthese (CARRUTHERS und WINEGRAD (1962), die Glykogensynthese (LEONARD und LANDAU 1960; JEANRENAUD und RENOLD 1959; CAHILL, LEBOEF und RENOLD 1959) und die Proteinsynthese (KRAHL 1959). Derartige intrazelluläre Stoffwechselvorgänge können auch in vivo von Insulin abhängig sein, wie das Eindringen von ^{131}J Insulin ins Zellinnere beweist GRIMMINGER et al. 1964; STERNE 1964). Bei Benutzung von $\left[1\text{-}^{14}C\right]$-Leucin ist die radioaktive Markierung des fettfreien Gewebsrückstandes unter Triamteren und Insulin geringer als unter Insulin allein. Auch bei diesem von Glukose unabhängigen, aber insulin-

empfindlichen Aminosäureeinbau ins Protein schränkt Triamteren die Auswirkung des Insulins erheblich ein. Der Einstrom von Aminosäuren ins Zellinnere wird dabei nicht merklich beeinflußt, denn die Höhe der Radioaktivität im Außenmedium nach dem Versuch zeigt unter Insulin und unter Insulin und Triamteren keine Unterschiede zu den Kontrollwerten.

Wie schon erwähnt, fanden auch KRAHL 1959 und GOODMAN 1966, daß der Einstrom von Aminosäuren in die Fettgewebszellen von Insulin unabhängig ist. Die Verhältnisse beim Herzmuskel der Ratte scheinen dagegen anders zu sein. SCHARFF und WOOL zeigten 1965, daß beim perfundierten Rattenherzen die Aufnahme von Aminosäuren in die Muskelzellen insulinabhängig ist. Daß die insulinabhängige Proteinsynthese im Fettgewebe unter Triamteren eingeschränkt ist, läßt vermuten, daß diese Substanz tatsächlich die funktionelle Auswirkung des Insulins aufhebt. Gleichsinnig sind die Ergebnisse beim Einfluß des Triamterens auf die Glykogensynthese. Auch hier liegen die Werte unter Insulin und Triamteren niedriger als bei Insulin allein. In der benutzten Versuchsanordnung geht aber der oben beschriebene Hemmeffekt auf die Glukoseaufnahme mit ein. Nur ein Anteil der eingeschleusten Glukose wird zur Glykogensynthese herangezogen. Nach Berechnungen von JEANRENAUD und RENOLD (außerdem eigene Berechnungen) liegt der Prozentsatz bei 1 - 2 %. Verantwortlich für die Synthese

ist dabei die aktive Form der Glykogensynthetase, deren Anteil durch Insulin gesteigert werden kann (VILLAR-PALASI und LARNER 1961). Nach diesen Untersuchungen kommt der Aktivität des Enzymsystems eine größere Bedeutung für die Syntheserate zu, als der angebotenen Substratkonzentration. LEONARDS und LANDAU (1960) konnten auch zeigen, daß bei gleichstarker Glukoseanreicherung mit hohen Glukosekonzentrationen im Außenmedium und mit Insulin ein vermehrter Glukoseeinbau in Glykogen nur unter Insulin zu finden ist. In diesem Sinne läßt sich die geringe Markierung des Glykogens unter dem Einfluß von Triamteren als Einschränkung der insulinempfindlichen Glykogensynthese interpretieren. Wenn ein vielfach benutztes Therapeutikum wie das Triamteren einen so fundamentalen Stoffwechselvorgang wie die periphere Insulinwirkung hemmt, so kommt den Fragen wie Hemmkonzentration, Wirkungseintritt, Verteilung, möglichen Antagonisten und anderen Begleitumständen eine besondere Bedeutung zu. Bei einem mittleren Gewebsgewicht von 150 mg in 5 ml Medium ergeben sich halbmaximale Hemmkonzentrationen von 5.10^{-5} M. Mit 2.10^{-4} M ist die Hemmung vollständig. Die hohe Lipoidlöslichkeit der Substanz läßt erwarten - sichtbar an der nachlassenden Fluoreszenz des Außenmediums - daß innerhalb des Gewebes eine Anreicherung der Substanz stattfindet. 17 - 24 % des zugesetzten Triamterens waren nach der Inkubation aus dem Außen-

medium verschwunden. Bei Gleichverteilung im Gewebe könnten maximale Konzentrationen von $3{,}8.10^{-4}$ M für die halbmaximale Hemmung, resp. 8.10^{-4} M für die vollständige Hemmung auftreten. Tatsächlich läßt sich auch zeigen, daß bei verdoppelten Gewebsgewichten eine Verdoppelung der Triamterenhemmkonzentration notwendig ist, um den gleichen Hemmeffekt zu erzielen. Dieser Hemmeffekt tritt in vitro sehr rasch auf und ist schon innerhalb des ersten Meßintervalls von 30 Minuten zu sehen. Dieser rasche Wirkungseintritt findet seine Parallele bei der renalen Wirksamkeit (HERKEN, SENFT und ZEMISCH 1964) dieser Substanz. Er steht aber im Gegensatz zum verzögerten Wirkungseintritt des 6-Aminonikotinamids am Fettgewebe (v. BRUCHHAUSEN und HERKEN 1966) und an der Niere. Offenbar wirkt Triamteren als solches, ohne in ein Adenindinucleotid- bzw. in ein Adenindinucleotidphosphat-Analoges umgewandelt zu werden, während 6-Aminonikotinamid der Umwandlung bedarf.

Dementsprechend lassen Nikotinamid und Adenindinucleotid die Hemmwirkung des Triamterens auf den Glukosetransport unbeeinflußt. Daraus läßt sich ebenfalls wie aus dem erwähnten schnellen Wirkungseintritt folgern, daß eine Adenindinucleotid-Analogonbildung des Triamterens keine entscheidende Rolle spielt.

Die Bedeutung der strukturellen Besonderheit des Triamterens für die beschriebenen Hemmwirkungen läßt sich

beim Vergleich ähnlicher Pteridinderivate abschätzen. Ähnlich wie Triamteren wirkt sein Dimethoxyderivat (Abb. 9) hemmend auf die Glukoseaufnahme. Diese Substanz wirkt ebenfalls schwach kaliuretisch (SENFT, unveröffentlichte Angabe). Fehlt dagegen die Methylgruppe, handelt es sich also um das p-Hydroxylderivat des Triamterens, geht die Hemmwirkung auf das Fettgewebe in vergleichbaren Konzentrationen verloren. Dafür hebt diese Substanz, die auch als physiologisches Umwandlungs- und hauptsächliches Abbauprodukt gilt (LEHMANN 1965), die Hemmwirkung des Triamterens am Fettgewebe teilweise auf. Möglicherweise schränkt die Bildung diese Substanz im Körper die Auswirkung des Triamterens auf den insulinabhängigen Glukosetransport am Fettgewebe ein und verhindert damit das Auftreten einer Hyperglykämie unter Triamteren. Denn bei Ratten treten nach Gabe von Triamteren selbst unter den Bedingungen der Glukosebelastung keine erhöhten Blutzuckerkonzentrationen auf (SENFT, unveröffentlichte Angaben).

Die Wirkung des potentiellen Komplexbildners Triamteren auf die insulinabhängige Glukoseaufnahme wird durch Ionen nur wenig beeinflußt. Ionenverschiebungen durch Insulin sind aber anzunehmen, da HERRERA 1965 nachwies, daß Insulin an der Blasenhaut einen Anstieg des Membranpotentials und damit größere transzelluläre Natriumbewegungen, d.h. einen verstärkten aktiven Natriumtransport veranlaßt. Umge-

kehrt haben BABA et al. für Triamteren einen Abfall des Ruhepotentiales des Kurzschlußstromes und des Natrium In- und Effluxes an der Krötenhaut beschrieben. Diese Erscheinungen sind als Hemmung des aktiven Natriumtransportes zu deuten. Für die Fettgewebsmembran liegen gleichartige Beobachtungen nur insofern vor, als ZIERLER (1959) und BEIGELMANN und HOLLANDER (1962) unter Insulin einen Anstieg des elektrischen Ruhepotentiales beschrieben.

Bei unseren Versuchen wird bei Ersatz der Natriumionen durch Kaliumionen im Außenmedium sowohl die basale als auch die insulinabhängige Glukoseaufnahme wie bei HAGEN et al. (1959) um etwa 50 % eingeschränkt. Bei fehlenden Natriumionen wird der Hemmeffekt des Triamterens auf die insulinabhängige Glukoseaufnahme nicht aufgehoben, sondern es läßt sich eine Ausweitung des Triamterenhemmeffektes auf die basale Glukoseaufnahme erkennen. Im Muskel sahen KIPNIS und PARISH 1965 ebenfalls eine fehlende Zuckeraufnahme im kaliumreichen, natriumarmen Milieu. Diese einseitige Ionenverarmung könnte die Triamterenwirkung besonders begünstigen, wenn Triamteren ähnlich wie an der Niere (BUSS-LAASEN und NIELSEN 1963) den Ausstrom von Kalium aus der Zelle hemmt.

Dieser Frage muß noch nachgegangen werden, zumal GOURLEY und BETHEA 1964 am Fettgewebe beobachteten, daß es während der Inkubation Kalium an das Medium

abgibt. Durch kombinierte Gaben von Insulin und Glukose kann dies zurückgedrängt werden. In diesen Versuchen wurde der Extrazellulärraum nicht berücksichtigt.

Stöchiometrisch gleiche Zugaben von Zink- und Chromionen zu den durch Triamteren gehemmten Ansätzen lassen erkennen, daß dessen Wirkart nicht auf der Ausschaltung dieser Ionen beruhen kann. Die von MERTZ und ROGINSKI 1963 ermittelte optimale Chromionenkonzentration ließe sich allerdings nur in größeren Versuchsreihen in Anwesenheit von Triamteren ermitteln. Halbstöchiometrische Konzentrationen verhalten sich aber nicht anders als einfach oder zweifach stöchiometrische.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Die Wirkung von Triamteren auf die Abnahme von Glukose im Außenmedium und die $^{14}CO_2$ Abgabe aus [1-^{14}C]-D Glukose wurde am epididymalen Fettgewebe der Ratte in Gegenwart und Abwesenheit von Insulin untersucht.

2. Triamteren hemmt die insulinabhängige Glukoseaufnahme ins Fettgewebe. Die halbmaximale Hemmkonzentration liegt bei 5.10^{-5} M. Der Triamterenhemmeffekt auf die durch Insulin geförderte $^{14}CO_2$ Produktion aus [1-^{14}C]-D Glukose ist geringfügig schwächer als auf die Glukoseaufnahme. Diese Wirkungen sind durch das p-Hydroxylderivat des Triamterens aufhebbar, nicht dagegen durch Adenindinucleotid, Nikotinamid und höhere Insulingaben.

3. In ähnlichem Ausmaß schränkt Triamteren den insulinabhängigen Einbau von [1-^{14}C]-D Glukose in die Lipidfraktionen und das Glykogen des Fettgewebes und den Einbau von [1-^{14}C] Leucin in das Protein des Fettgewebes ein.

4. Die Triamterenhemmwirkung wird bei Entzug von Kalium- und Natriumionen im Außenmedium nicht aufgehoben. Im kaliumhaltigen, natriumarmen Außenmilieu verhindert Triamteren die Glukoseaufnahme vollständig.

Zusätze von Magnesium-, Mangan-, Zink-, Eisen-, und Chrom-Ionen zum Inkubationsmedium haben keinen Einfluß auf die Triamterenhemmwirkung.

5. Das Diuretikum Triamteren hemmt somit unabhängig von Kalium- und Natriumionen insulinstimulierbare Stoffwechselreaktionen im Fettgewebe. Es verhindert in vitro die stoffwechselregulierende Funktion dieses Hormons.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ANDERSON, J., G. HOLLIFIELD und J.A. OWEN, jr.: The effects of coffeine, deoxyribose nucleic acid, and insulin on the metabolism of glucose by adipose tissue in vitro.
Metabolism, 15, 30 (1966)

BABA, W.J., G.R. TUDHOPE und G.M. WILSON: Site and mechanism of action of the diuretic triamteren.
Cli. Sci. 27, 181 (1964)

BARNETT, C.A. und J.E. WHITNEY: The effect of diazoxide and chlorothiazide on glucose uptake in vitro.
Metabolism, 15, 88 (1966)

BEARDWOOD, D.M., J.S. ALDEN, C.A. GRAHAM, J.T. BEARDWOOD, jr. und A. MARBLE: Evidence for a peripheral action of chlorothiazide in normal man.
Metabolism, 14, 561 (1965)

BEIGELMANN, P.: Additional studies with insulin bioassay employing glucose uptake by rat adipose tissue.
Metabolism, 11, 1315 (1962)

BEIGELMANN, P. und P.B. HOLLANDER: Effects of hormones upon adipose tissue membrane electrical potential.
Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 116, 31 (1964)

BORGSTRÖM, B.: Investigation on lipid separation methods. Separation of phospholipids from neutral fat and fatty acids.
Acta physiol. scand. 25, 101 (1962)

v. BRUCHHAUSEN, F. und H. HERKEN: Wirkung des 6-Aminonikotinamids auf die insulinabhängige Glukoseaufnahme in das epididymale Fettgewebe.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path. 254, 388 (1966)

BUSS-LASSEN, J. und O.E. NIELSEN: Investigations into the diuretic effect and elimination of triamteren. Acta pharmacol. tox. 20, 309 (1964)

CAYGILL, C.P.J. und W.D. STEIN: Glucose uptake by isolated fat cells and the influence of insulin. J. biol. Chem. 239, 375 (1964)

CAHILL, G.F., B. LEBOEUF und A.E. RENOLD: Studies on rat adipose tissue in vitro. III. Synthesis of glycogen and glycerid glycerol. J. biol. Chem. 234, 2540 (1959)

CARRUTHERS, B.M. und A.I. WINEGRAD: Effects of insulin on aminoacid and ribonucleic acid metabolism in rat adipose tissue. Amer. Journal Physiol. 202, 605 (1962)

CHRISTIAN, G.D., E.C. KNOBLOCK, W.C. PURDY und W. MERTZ: A polarographic study of chromic-insulin-mitochondrial interaction. Biochim. Biophys. Acta 66, 420 (1963)

CROFFORD, O.B. und A.E. RENOLD: Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue. Rate limiting steps and site of insulin action. J. biol. Chem. 240, 14 (1965 a)

CROFFORD, O.B. und A.E. RENOLD: Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue. Characteristics of glucose transport system and action of insulin. J. biol. Chem. 240, 3237 (1965 b)

DAVSON, K.G. und J.C. BECK: The effect of puromycin on insulin and grothhormone actions in the rat epididymal fat pads. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 67, (1963)

DITSCHUNEIT, H., C.S. AHN, M. PFEIFFER und E.F. PFEIFFER: Über die Bestimmung von Insulin im Blut am epididymalen Fettanhang der Ratte mit Hilfe markierter Glukose.
Klin. Wschr. 37, 1234 (1959)

FAIN, J.N.: Effects of dexamethasone and 2-deoxy-D-glucose on fructose and glucose metabolism by incubated adipose tissue.
J. biol. Chem. 239, 958 (1964)

FIELD, J.B. und S. MANDELL: Effects of thiazides on glucose uptake and oxydation of rat muscle and adipose tissue.
Metabolism, 13, 959 (1964)

FLATT, J.P. und E.G. BALL: Studies on the metabolism of adipose tissue. XV. Evaluation of the major pathway of glucose catabolism as influenced by insulin and epinephrine.
J. biol. Chem. 239, 675 (1964)

FOLCH, P.M. LEES und G.H. SLOANE-STANLEY: A simple method for the isolation and purification of total lipide from animal tissues.
J. biol. Chem. 226, 497 (1957)

FROESCH, E.R. und J.L. GINSBERG: Fructose metabolism of adipose tissue. I. Comparison of fructose and glucose metabolism in epididymal adipose tissue of normal rats.
J. biol. Chem. 237, 3317 (1962)

GOODMAN, H.M.: alpha-amino isobutyric acid transport in adipose tissue.
Amer. J. Physiol. 211, 815 (1966)

GODD, G., H. KRAMER und M. SOMOGYI: The determination of glycogen.
J. biol. Chem. 100, 485 (1933)

GOURLEY, D.R.H. und M.D. BETHEA: Insulin effect on adipose tissue sodium and potassium.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 115, 821 (1964)

GRIMMINGER, H., V.SASIVIMOLKUL und G. KALLEE: Nachweis von injiziertem ^{131}J-Insulin im Zellinnern.
Z. Naturforsch. 19b, 357 (1964)

HAGEN, J.M., E.G. BALL und O. COOPER: Studies on the metabolism of adipose tissue. II. The effects of changes in the ionic composition of the medium upon the response of insulin.
J. biol. Chem. 234, 781 (1959)

HERKEN, H. und G. SENFT: 2,-4,-7,-Triamino-6-phenyl-pteridin als "Aldosteronantagonist".
Klin. Wschr. 39, 1205 (1961)

HERKEN, H., V. NEUHOFF und G. SENFT: Biosynthese eines pteridinhaltigen Nucleotids in der Niere nach Applikation von Triamteren.
Klin. Wschr. 43, 960 (1965)

HERNANDEZ, A. und A. SOLS : Transport and phosphorylation of sugars in adipose tissue.
Biochem. J. 86, 166 (1963)

HERRERA, M.G. und A.E. RENOLD: Normal effects of glycine metabolism in rat epididymal adipose tissue.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 44, 165 (1960)

HERRERA, M.G.: Effect of insulin on short-circuit current and sodium transport across urinary bladder.
Am. J. Physiol. 209, 819 (1965)

JEANRENAUD, B. und A. E. RENOLD: Studies on rat adipose tissue in vitro. IV. Metabolic patterns produced in rat adipose tissue by varying insulin concentrations indepently from each other.
J. biol. Chem. 237, 3082 (1959)

KATZEN, H.M. und R.T. SCHIMKE: Multiple forms of hexokinase in the rat: tissue distribution, age dependency, and properties.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 54, 1218 (1965)

KIPNIS, D.M. und J.E. PARISH: Role of Na^+ und K^+ on sugar (2-deoxy-glucose) and amino acid (-aminoisobutyric acid) transport in striated muscle.
Fed. Proc. 24, 1051 (1965)

KRAHL, M.E.: Incorporation of (^{14}C) amino acid precursion into adipose tissue protein: an insulin stimulation not involving glucose or amino acid transport.
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 35, 556 (1959)

KUO, J.F., J.K. DILL und C.E. HOLMLUND: Inhibition by phlorizin of insulin-and protease-stimulated glucose utilization in isolated adipose cells.
Biochim. Biophys. Acta 144, 252 (1967)

LANDAU, B.R. und J. KATZ: A quantitative estimation of the pathways of glucose metabolism in rat adipose tissue in vitro.
J. biol. Chem. 239, 697 (1964)

LEBOEUF, B., A.E. RENOLD und G.T. CAHILL: Studies on rat adipose tissue in vitro: further effects of cortisol in glucose metabolism.
J. biol. Chem. 237, 988 (1962)

LEHMANN, K.: Trennung, Isolierung und Identifizierung von Stoffwechselprodukten des Triamteren. Arzneimittelforschung, 7, 812 (1965)

LEONARD, J.R. und B.R. LANDAU: A study of the equivalence of metabolic patterns in the rat adipose tissue: insulin versus glucose concentration. Arch. Biochim. 91, 194 (1960)

MERTZ, W. und E.E. ROGINSKY: The effect of trivalent chromium on galactose entry in rat epididymal fat tissue. J. biol. Chem. 238, 868 (1963)

MOORE, R.O., A.M. CHANDLER und N.TETTENHORST: Glucose-ATP-transferases in adipose tissue of fasted and refed rats. Biochim. biophys. Res. Coomun. 17, 527 (1964)

ROUS, S. und P. FAVAGER: The influence of bicarbonate upon fatty acid synthesis in vitro. Med. exp. 11, 303 (1964)

SCHARFF, R. und I.G. WOOL: Accumulation of amino acide in muscle of perfused rat heart. Effects of insulin. Biochem. J. 97, 257 (1965)

SILVERMANN, J.L.: Glucosamine inhibition of (1-^{14} C) glucose oxydation was measured by rat adipose tissue in vitro. Biochim. biophys. Acta (Amst.) 78, 94 (1965)

SENFT, G., W. LOSERT, G. SCHULTZ, R. SITT und H.K. BARTELHEIMER: Ursachen der Störungen im Kohlehydratstoffwechsel unter dem Einfluß sulfonamidierter Diuretica. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. u. exp. Path. 255, 369 (1966)

SENFT, G.: Beeinflussung hormonaler und enzymatischer Regulationen des Kohlehydratstoffwechsels bei Anwendung von Benzothiadiazinen.
Der Internist, 7, 426 (1966)

SENFT, G.: Störungen im Kohlehydratstoffwechsel nach Gabe diuretisch wirksamer Substanzen.
Therapeutische Umschau, 24, 301 (1967)

SOLS, A., A. SILLERO und J. SALAS: Insulin-dependent synthesis of glucokinase.
J. cell. comp. Physiol. 66, Suppl. 1,23 (1965)

STERNE, J.: The present state of knowledge on the mode of action of the antidiabetic diguanides.
Metabolism, 13, 791 (1964)

SUND, H.: Zinkenzyme: Funktion und Struktur.
Z. nat. med. Grundlf. 2, 284 (1965)

SUTHERLAND, E.W.: The effect of the hyperglycemic factor of the pancreas and of epinephrine on glycogenolysis.
Recent Progr. Hormone Res. Vol. V, 441 (1950)

TELLER, R. und P. BEIGELMANN: Effects of various amino acids upon glucose uptake on rat epididymal adipose tissue.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 106,484 (1961)

VILLAR-PALASI, C. und J. LARNER: Insulin treatment and increased UDPG-glycogen transglucosylase activity in muscle.
Arch. Biochem. Biophys. 94, 436 (1961)

VAUGHAM, M.: Effect of hormones on glucose metabolism in adipose tissue.
J. biol. Chem. 236, 2196 (1961)

WEBER, G., H.J. HIRD, N.B. STAMM und D.S. WAGLE: Enzymes involved in carbohydrate metabolism in adipose tissue.
Handbook of Physiology 5, Adipose tissue (Renold und Cahill edit.) Washington 1965

WINEGRAD, A.I. und A.E. RENOLD: Studies on rat adipose tissue in vitro. I. Effects of insulin on the metabolism of glucose, pyruvate and acetate.
J. biol. Chem. 233, 267 (1958)

WINEGRAD, A.I. und A.E. RENOLD: Studies on rat adipose tissue in vitro: II. Effects of insulin on the metabolism of specifically labelled glucose.
J. biol. Chem. 233, 273 (1958)

WOLFF, F.W. und W.W. PARMLEY: Further observations concerning the hyperglycemic activity of benzothiadiazines.
Diabetes 13, 115 (1964)

ZIERLER, K.L. Effect of insulin on membrane potential and potassium content of rat muscle.
Amer. J. Physiol. 197, 515 (1959).

Herrn Professor Dr. med. Hans Herken und
Herrn Privatdozent Dr. med. Franz von Bruchhausen danke ich für die wertvollen Anregungen und Ratschläge bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 29.11.1939 als Sohn des Tierarztes Dr. Hermann Voß und seiner Ehefrau Josefa, geborene Hunold in Geseke/Westfalen geboren.

Ich besuchte von 1946 bis 1950 die Volksschule und von 1950 bis 1956 das Progymnasium in Geseke. 1956 ging ich an das Städt. neusprachliche Gymnasium in Paderborn, wo ich im März 1959 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommer 1959 wurde ich an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn immatrikuliert und studierte dort bis zum Wintersemester 1961/62. Ich setzte mein Studium an der Freien Universität Berlin fort und bestand im April 1965 das medizinische Staatsexamen.

Als Medizinalassistent arbeitete ich im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin, in der Chirurgischen und in der II. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Neukölln und in der Geburtshilflich-gynäkologischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Moabit. Im Juli 1967 bekam ich die Approbation und arbeite seitdem als Assistent in der Chirurgischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Neukölln.

Die Dissertation begann ich im Juni 1965.